

平成 30 年 5 月 28 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K01297

研究課題名(和文)リアルタイムバイオリジオグラフィ法の開発と応用研究

研究課題名(英文)Development of Quality Control Method in Regenerative Medicine Products Using a Bioradiography

研究代表者

佐々木 徹 (Sasaki, Toru)

北里大学・医療衛生学部・准教授

研究者番号：30158927

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：(1)供給性低酸素と必要性低酸素の解除過程における活性酸素の生成を、リアルタイムバイオリジオグラフィ法を用い、組織のレドックス、酸素分圧と関連付けて解析した。その結果、供給性と必要性低酸素いずれも、低酸素の解除過程において活性酸素の生成が亢進を認め、その生成機序に低酸素組織のレドックスの過還元シフト「還元ストレス」の関与が示唆された。(2)再生医療向け培養組織の移植前の品質管理へのリアルタイムバイオリジオグラフィ法の応用を目指し、ヒト表皮細胞を対象に基礎的検討を試みた。その結果、FDG-バイオリジオグラフィ法を用いた組織の生存性や健全性の評価の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigated reactive oxygen species (ROS) generation in cerebral cortex slices during the restoration of hypoxia caused by a decreased oxygen supply and a transiently enhanced energy metabolism, with tissue pO<sub>2</sub> changes and redox balance using real-time bioradiography. ROS generation was transiently enhanced during reoxygenation in both hypoxic cases. The redox balance shift towards reduction “hyper-reduction” in tissue were suggested to participate in increased ROS generation under the restoration of transient hypoxia induced by a decreased oxygen supply and increased oxygen demand. To investigate whether it is possible to estimate the safety, soundness and effectiveness of transplantable tissues and organs by FDG-bioradiography method in a non-invasive manner, we examined the FDG uptake in reconstructed human cultured epidermal model. This result suggested the possibility of quality control in regenerative medical products using FDG - biodiography.

研究分野：放射線科学

キーワード：還元ストレス 活性酸素 レドックス 酸化ストレス 再生医療 分子イメージング 品質管理

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 老化の進行および加齢関連疾患の発症への「酸化ストレス」の関与が示唆されるが、未解明の点も多い。我々は、陽電子断層撮像法 (PET) 薬剤の放射能とバイオイメージングの化学発光計測の融合を図り、生組織の代謝・機能画像を動的に収集、解析するイメージング法「リアルタイムバイオラジオグラフィ法」を開発し、脳の疾患 (虚血-再灌流) や加齢と活性酸素の関係について検討してきた。その結果、低酸素処理後の再酸素時に活性酸素の生成亢進が認められること、脳組織の活性酸素の生成は加齢にともなって直線的に増加すること、また、その増加は動物種固有の最大寿命と逆相関があることを示した。我々は、これらの研究を進める中で、「低酸素」に注目して新たな理論を提案するに至った。すなわち、「低酸素」とは血流による酸素の供給と組織における酸素消費のバランスで考えるべきで、酸素の消費の低下した状態 (例えば、低温時、冬眠など) では、酸素の供給が低下しても低酸素にはならない。一方、酸素消費が亢進した状態 (病的な例ではてんかんの発作時など) では、酸素供給があっても低酸素の状態がありうると考えた。このような低酸素の状態には組織は還元的になり、これが再酸素時の活性酸素生成亢進の原因になるとの仮説を得た。

(2) 幹細胞や iPS 細胞から組織や臓器を作製、宿主に移植 (再生医療) が具現化しつつある。これに伴い、厚生労働省は平成 26 年「再生医療等製品の製造管理及び品質管理の基準」を定め、当該組織・臓器の健全性、有効性、安全性や人の健康に与える影響を適正に評価することが求められている。しかし、現在行われている品質管理では、並行培養した組織・臓器に実施されており、移植する組織・臓器そのものの安全性・健全性 (癌化、細胞生存率など) 事前評価は実施されていない。

## 2. 研究の目的

(1) 低酸素-再酸素の過程で亢進する活性酸素の生成機序の研究を進める中で、「低酸素」に注目して新たな理論を提案するに至った。すなわち、「低酸素」とは血流による酸素の供給と組織における酸素消費のバランスで考えるべきで、酸素の消費の低下した状態 (例えば、低温時、冬眠など) では、酸素の供給が低下しても低酸素にはならない。一方、酸素消費が亢進した状態 (病的な例ではてんかんの発作時など) では、酸素供給があっても低酸素の状態がありうると考えた。我々は、酸素の供給低下による「低酸素」に続く再酸素時に、活性酸素の生成亢進が認められることを示したが (虚血再灌流モデル)、酸素消費亢進による「低酸素」の後にも、活性酸素の生成亢進が起こり、酸化ストレスの背景には、組織の過還元状態があるとの仮説「還元ストレス理論」を得るに至った。本研究は、これ

まで行ってきた画像化法で解析可能な活性酸素、糖代謝の評価に加え、組織の微小領域での酸素、レドックス環境の計測し、活性酸素の生成亢進の原因になりうる因子との関係を明らかにすることで、「還元ストレス理論」の実証を試みた。

(2) 機能を失った臓器や組織の代替品を作製し、宿主に移植する再生医療の具現化に伴い、その健全性、有効性、安全性の品質管理が求められている。しかし、現行の品質管理は、並行培養した組織・臓器に実施されており、移植する組織・臓器そのものには行われていない。本研究は、我々が開発した新しいイメージング法「リアルタイムバイオラジオグラフィ法」を移植に供する組織・臓器そのものの安全性・健全性を非侵襲的に評価する「品質管理」に応用することを想定し、PET で汎用される [F-18] フルオロデオキシグルコース (FDG) を用いた品質管理技術の開発に関する基礎的検討を、ヒト培養皮膚組織を対象に遂行した。

## 3. 研究の方法

(1) 脳組織スライスへ供給する酸素を一時的に窒素に置換することで生ずる低酸素 (供給性低酸素) と高カリウム処理によって組織のエネルギー需要を一時的に亢進することで生ずる低酸素 (需要性低酸素) の解除過程の活性酸素の生成を化学発光によるイメージングから評価した。さらに、組織のレドックスと酸素分圧をマイクロセンサで測定し、活性酸素の生成との関係を調べた。

(2) ヒト 3 次元培養表皮を対象に FDG-バイオラジオグラフィ法を応用すべく、解析用イメージングチャンバーを開発した。次いで、FDG の培養表皮取り込みに対する 時間 放射能、放射能濃度、最適な培養液組成、培養液中のグルコース濃度の影響、細胞障害性を有する各種毒物の影響を、生細胞数、細胞生存率の指標である MTT (ホルマザン法) と対比させて検討した。

## 4. 研究成果

(1) 供給性低酸素と需要性低酸素いずれも低酸素の解除過程において活性酸素の生成が亢進した。活性酸素の生成亢進の認められる前の時期 (低酸素時) には、マイクロセンサで測定した組織の酸素分圧に低下が認められ、同時に組織のレドックスは還元側に傾くことが明らかになった。以上の検討から、低酸素状態の組織ではレドックスが還元シフトし、この状態が続いて起こる活性酸素の生成亢進の原因であると考えられた。以上の結果から、低酸素の解除過程における活性酸素の生成亢進に低酸素組織のレドックスの過還元シフト「還元ストレス」の関与が示唆された。

(2) 「バイオラジオグラフィ法」を用いて培養表皮の FDG の 2 次元分布をダイナミック (30 分毎) に画像収集することができた。

FDG の組織取込は、培養液のグルコース濃度（1, 2, 5, 10, 20mM）に依存して低下した。このことから、FDG の皮膚組織取り込みに、グルコース特異的取り込み機構が関与することが示唆された。FDG の組織取込は、培養液に加えた各種毒物（硫酸、塩酸、オクタン酸、水酸化ナトリウム）によって著しく低下した。同様に、FDG の組織取込は、細胞膜溶解性を示すドデシル硫酸ナトリウム（SDS）の添加によって、濃度依存的に低下した。FDG の組織取込の低下は、MTT 試薬で評価した組織の生存率の低下と一致した。以上の結果から、FDG-バイオラジオグラフィ法を用いて組織の生存性や健全性を評価できることが示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

##### 〔雑誌論文〕(計7件)

Sasaki T, Aoki K, Yamashita R, Hori K, Kato T, Saito M, Niisawa K, Nagatsu K, Nozaki T, Development of an externally controllable sealed isotope generator. Appl Radiat Isot, 査読有, 2018, Vol.133, No.3, pp. 51-56

Sasaki T, Awaji T, Shimada K, Sasaki H, Increased levels of reactive oxygen species in brain slices after transient hypoxia induced by a reduced oxygen supply. Neuropsychiatry, 査読有, 2018, Vol.8, No.2  
DOI:10.4172/Neuropsychiatry.1000392 &copy; 2018

野崎正, 永津弘太郎, 葉袋佳孝, 佐々木徹, 広い教育分野における<sup>68</sup>Ge/<sup>68</sup>Ga ジェネレータを用いる諸実験の活用 - ラジオアイソトープの新利用 - 放射化学, 査読有, 2017, Vol. 35, pp. 64-81

Sasaki T, Awaji T, Shimada K, Sasaki H, Reactive oxygen species generation increases in cerebral cortex slices after the transiently enhanced metabolic activity. Neurosci Res, 査読有, 2017, Vol.123, pp. 55-64

Sasaki T, Shinkai T, Tahara S, Kuramoto K, Kaneko T, Kondo H, Comparison of body composition between spontaneous dwarf and wild-type rats during aging: A quantitative X-ray computed tomographic study. Radioisotopes, 査読有, 2016, Vol.65, pp. 1-10

Izuo N, Nojiri H, Uchiyama S, Noda Y, Kawakami S, Kojima S, Sasaki T, Shirasawa T, Shimizu T, Brain-specific superoxide dismutase 2 deficiency causes perinatal death with spongiform encephalopathy in mice. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 査読,

<http://dx.doi.org/10.1155/2015/238914>

Sasaki T, Mogi S, Kaneko T, Kojima H, Katoh S, Sano A, Kojima S, Relationship between tissue hydroxyl radical and oxidatively modified macromolecule levels. Geriatr Gerontol Int, 査読有, 2014, Vol.14, No.2, pp.498-507

##### 〔学会発表〕(計7件)

佐々木徹, 青木勝己, 堀拳輔, 山下涼輔, 永津弘太郎, 野崎正, 外部制御型密封機能線源の開発, 第54回 アイソトープ・放射線研究発表会, 東京, 2017年7月5-7日

佐々木徹, 西澤健太郎, 玉木潤耶, 佐々木晴代, 再生医療向け培養組織の品質管理技術の開発-バイオラジオグラフィ法を用いた研究-, 第54回 アイソトープ・放射線研究発表会, 東京, 2017年7月5-7日

青木勝己, 加藤大河, 齋藤美咲, 小川幸次, 永津弘太郎, 野崎正, 佐々木徹, 外部制御可能な密封線源の開発, 第53回 アイソトープ・放射線研究発表会, 東京, 2016年7月6-8日

野崎正, 佐々木徹, 小川幸次, <sup>68</sup>Ge/<sup>68</sup>Ga ジェネレータの教育利用, 第53回 アイソトープ・放射線研究発表会, 東京, 2016年7月6-8日

佐々木徹, 小野寺将真, 淡路拓史, 島田和良, 加賀美信幸, 還元ストレス理論の検証に関する研究, 第39回日本基礎老化学会, 伊勢原, 2016年5月27-28日

野崎正, 佐々木徹, 小川幸次, 広い教育分野における<sup>68</sup>Ge/<sup>68</sup>Ga Generator を用いる諸実験の活用, 第52回 アイソトープ・放射線研究発表会, 東京, 2015年7月8-10日

佐々木徹, 新海正, 田原正一, 倉本和直, 金子孝夫, 近藤昊, 小動物用X線CTを用いた矮小ラットの体脂肪および骨の加齢変化の測定, 第38回日本基礎老化学会, 横浜, 2015年6月13-14日

##### 〔図書〕(計1件)

垣花泰之(特集編集), 佐々木徹(分担執筆), 総合医学社, ショック管理 ショックと臓器障害連関のメカニズム, 2017, Vol.29, No. 5-6, pp. 343-348

##### 〔産業財産権〕

##### 出願状況(計2件)

名称: 培養組織の直接的検査方法

発明者: 佐々木徹

権利者: 学校法人 北里研究所

種類: 特許

番号: 特願 2017-111738

出願年月日：平成 29 年 6 月 6 日  
国内外の別： 国内

名称：線源  
発明者：佐々木 徹  
権利者：学校法人 北里研究所  
種類：特許  
番号：特願 2015-122154  
出願年月日：平成 27 年 6 月 17 日  
国内外の別： 国内

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www.kitasato-u.ac.jp/ahs/>

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

佐々木 徹 (SASAKI, Toru)  
北里大学・医療衛生学部・准教授  
研究者番号：30158927